

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Sievert)

Die Hemmung der Synthese des Herpes-Simplex-Virus durch Actidion®

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Klaus-Dieter Niessing
aus Kiel

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Die Hemmung der Synthese des Herpes-Simplex-Virus durch Actidion®

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus-Dieter Niessing
aus Kiel

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg / Lahn am 28.11.1966
gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. et Dr. med. dent. H. Heuser

Referent: Dozent Dr. D. Falke

Correferent: Prof. Dr. R. Siegert

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>A. EINFÜHRUNG</u>	1
1. Das Herpes-simplex-Virus und seine Synthese	2
2. Lichtmikroskopische Veränderungen der infizierten Zelle	4
3. Hemmstoffe der Virusvermehrung	6
4. Chemotherapeutische Verwendung von Hemmstoffen	8
 <u>B. MATERIAL und METHODEN</u>	10
1. Virus	10
2. Zellkultur	10
3. Virustitration	11
4. Zellfärbung mit Acridin-orange	11
5. Fluoreszenzmikroskopie	12
6. Hemmstoffe	12
 <u>C. ERGEBNISSE</u>	13
1. Virusvermehrung	13
2. Der Einfluß von Actidion auf die Vermehrung des Herpes-simplex-Virus	15
a) Die Toxizität von Actidion gegenüber Kaninchennieren-Zellkulturen	15
b) Der Einfluß von Actidion auf freies Virus	16
c) Dosis-Wirkungs-Kurve	17
d) Zytologische Untersuchungen	19
e) Der Einfluß von Actidion auf die Adsorption und Penetration	23
f) Zeitliche Beziehungen zwischen Zugabe von Actidion und der Hemmung des zytopathischen Effekts sowie der Entstehung infektiöser Viria	24
g) Das "Überleben" von infektiösem Virus in den Zellen unter der Wirkung von Actidion	26

	Seite
3. Der Einfluß von Hemmstoff-Kombinationen auf die Virusvermehrung	27
<u>D. BESPRECHUNG der ERGEBNISSE</u>	30
<u>E. ZUSAMMENFASSUNG der ERGEBNISSE</u>	35
<u>F. LITERATURVERZEICHNIS</u>	36

A. EINFÜHRUNG

Die Herpes-Infektion besitzt nicht nur große klinische Bedeutung, sondern beansprucht auch hinsichtlich ihrer Pathogenese besonderes Interesse. Der Erreger (Herpes-simplex-Virus, Herpesvirus hominis) kann - im Gegensatz zu den meisten anderen Virusarten - trotz Anwesenheit humoraler Antikörper nach der Primärinfektion lebenslang im Körper persistieren (BURNET et al. 1939, STOKER 1957), ohne klinische Erscheinungen zu verursachen. Bei einem hohen Prozentsatz der latent Infizierten können sich aber wiederholte Rezidive mit charakteristischen Läsionen an den Orten der Primärinfektion abspielen, wenn das Gleichgewicht zwischen Virus und Organismus durch Reize unspezifischer Natur gestört wird. Es ist heute noch nicht bekannt, wo und in welcher Form das Virus in den betroffenen Wirtszellen verbleibt. Es wird vermutet, daß dort nicht näher bekannte Vorstufen des Virion als "latentes Herpes-Genom" persistieren und durch verschiedene Stimuli zur Reifung induziert werden können.

Eine Aufklärung der Zusammenhänge setzt einen tiefen Einblick in die normalen Synthesevorgänge voraus. Er ist bei dem heutigen Stand der Forschung kaum noch allein durch weitere morphologische Studien im Elektronenmikroskop an Dünnschnitten infizierter Zellkulturen zu erwarten. Ausichtsreicher sind zusätzliche Untersuchungen, bei denen Antimetabolite zur spezifischen Hemmung einzelner Schritte der Virussynthese benutzt werden. Es ergaben sich bereits dadurch einerseits Möglichkeiten zu einer spezifischen Behandlung des Herpes simplex corneae und andererseits auch wichtige Hinweise bezüglich der Besonderheit der Virus-Wirt-Beziehungen der Herpes-Infektion.

Zweck der Arbeit ist eine Untersuchung über die Hemmwirkung des Actidion, das bisher beim Herpes-simplex-Virus noch nicht geprüft wurde.

1. Das Herpesvirus und seine Synthese

Die Partikel des Herpes-simplex-Virus sind sphärische Gebilde in einem Größenbereich von 70 - 200 m μ (MUNCK u. ACKERMANN 1953, MORGAN et al. 1953/1954 u.a.). Elektronenmikroskopisch erkennt man in Ultradünnschnitten zwei sich in Größe und Struktur unterscheidende runde Partikelformen. Die kleineren inkompletten Viruspartikel (70 - 100 m μ) enthalten ein DNS-haltiges Binnenkörperchen (EPSTEIN 1962), das von einer aus strukturellen Untereinheiten (Capsomere) aufgebauten Schale (Capsid) umgeben ist. Daneben findet man größere Formen (160 - 180 m μ), sogenannte reife, infektiöse Viria, bei denen das Nucleocapsid von einer weiteren lipoproteinhaltigen Hülle umgeben ist (WILDY et al. 1960, CASPAR et al. 1962, WATSON u. WILDY 1963). Die wohl doppelspiralige Virus-DNS stellt keine umgebaute Zell-DNS, sondern eine Neusynthese dar (RUSSEL 1962, BEN-PORAT u. KAPLAN 1962).

Der erste Schritt bei der Auseinandersetzung des Virus mit der Wirtszelle ist die Adsorption, d.h. der räumliche Kontakt des infektiösen reifen Viruspartikels (Virion) mit der Zellwand, der sich vornehmlich in 15 - 30 Minuten vollzieht und in 2 Stunden in der Kultur abgeschlossen ist. Wie zunächst an dem Influenzavirus-Erythrocyten-Modell untersucht, verläuft der Vorgang in zwei Phasen, die in einer anfänglich reversiblen Bindung an die Zelloberfläche und der irreversiblen Adsorption bestehen (BURNET u. ANDERSEN 1946, PUCK u. SAGIK 1953 u.a.). Die erste Phase wurde als eine von elektrostatischen Kräften gelenkte Reaktion gedeutet, während die zweite einer Fermentreaktion entsprechen soll. Ähnliche Vorgänge sind für einige Viren auch am Virus-Kulturzellen-System beobachtet worden (BACHTHOLD et al. 1957 u.a.). Eine Verallgemeinerung dieser Beobachtungen hinsichtlich der Virusadsorption ist jedoch nicht ohne weiteres erlaubt (MUSGAY 1963), so daß es noch nicht als erwiesen gilt, ob die dargelegten Vorgänge auf das Herpes-Virus übertragbar sind, zumal bei ihm Rezeptor-substanzen für die Bindung an der Zelloberfläche nicht isoliert wurden.

Der Adsorption folgt die Penetration. Beim Influenzavirus läßt sich die Aufnahme in die Chorioallantois-Zellen nicht verhindern, wenn die Aktivität des Virusenzym (Neuraminidase) blockiert oder inaktiviert war. Diese Tatsache führte zu der Vorstellung, daß die Viria passiv durch "Viropexis" (FAZEKAS de ST. GROTH u. GRAHAM 1949) und nicht aktiv durch Enzymwirkung in die Zellen eindringen. Die Richtigkeit dieser Vermutung konnte erst viel später elektronenmikroskopisch bestätigt werden, als morphologisch intakte Vaccinia- und Adeno-Viruspartikel kurze Zeit nach der Zellinfektion im Plasma gefunden wurden (DALES u. SIMINOVITCH 1961, NIELSEN u. PETERS 1963). SIEGERT und FALKE (1963) sowie HOLMES u. WATSON (1963) konnten die Viropexis auch beim Herpes-simplex-Virus zeigen.

Auf die Penetration folgt sehr bald die Desintegration der Viria im Cytoplasma (SCOTT et al. 1953). Sie wird beim Vaccinia Virus (ABEL 1963) durch zwei "decoating"-Enzyme bewirkt, welche die DNS von den Hüllmembranen befreien. Die eingedrungenen Viruspartikel sind dann weder biologisch noch morphologisch nachweisbar, d. h. es beginnt die eigentliche Eklipse, die bis zur 9. - 12. Stunde dauert (KAPLAN 1957, STOKER et al. 1959, FALKE 1963).

Durch die Freisetzung der Nukleinsäure wird die Information für die Replikation der Virusnukleinsäure, für Fermente und Virushüllprotein freigegeben. Dieser Vorgang vollzieht sich in der Weise, daß sog. "Botschafter-RNS", welche die Information der Virus-DNS überträgt, an Ribosomen angelagert wird und Polysomen entstehen. An diesen Gebilden werden dann in einem komplizierten Mechanismus virusspezifische Proteine gebildet.

Im Zellkern, dessen Chromatin sich randständig anordnet, vereinigen sich die Virusbausteine zu inkompletten Teilchen und können sich zu kristallähnlichen Strukturen anordnen (MORGAN et al. 1958). Die morphologische Reifung der Partikel des hier benutzten Lennette-Stammes vollzieht sich beim

Durchtritt durch die Kernmembran, wobei sich Teile der inneren Kernlamelle bei Abschnürungen von Protrusionen um die Capside legen und zur Hülle (envelope) der Viria werden (FALKE, SIEGERT u. VOGELL 1959).

Bei dem HFEM-Stamm dagegen erhalten die inkompletten "nackten" Partikel ihre Hüllen wahrscheinlich erst beim Durchtritt durch Ausstülpungen der Zellmembranen (EPSTEIN 1962, WATSON u. WILDY 1963).

Unbekannt ist jedoch, ob Binnenkörperchen, Capsid und Hüllmaterial gleichzeitig entstehen und von einem bestimmten Zeitpunkt ab zu kompletten Partikeln zusammengesetzt werden, oder ob die Untereinheiten nacheinander programmiert werden und zu den Viria ausreifen.

2. Lichtmikroskopische Veränderungen der infizierten Zelle

Histologische Untersuchungen der durch Herpes-simplex-Viren verursachten Hautveränderungen am Menschen (LAUDA et al. 1926) ließen zwei Formen der Zelldegeneration erkennen, nämlich einerseits abgekugelte Zellen mit stark vergrößerten Kernen und andererseits vielkernige Riesenzellen. Von praktischem Interesse war die Feststellung der intranukleären Einschlusskörperchen, welche zur Diagnose des Herpes-simplex beitragen. Dieselben Erscheinungen wurden auch in mit Herpes-simplex infizierten Geweben der Kaninchenkornea (RIVERS et al. 1929), in der Chorioallantoismembran (WOLMAN et al. 1952) und in HeLa-Zellkulturen (SCHERER u. SYVERTON 1954 u.a.) beobachtet.

SOSA-MARTINEZ et al. (1955) isolierten erstmalig einen Herpes-simplex-Virusstamm auf Kaninchennieren-Zellkulturen, die sich als besonders empfänglich erwiesen. Auch dort stellte man die schon genannten Veränderungen fest, die in totaler Lysis der Zellen enden. Aus Berichten anderer Autoren (GRAY et al. 1958, NII et al. 1961) geht aber hervor, daß noch weitere Formen des zytopathischen Effekts auftreten können, nämlich großflächige Riesenzellen und Syncytien.

Manche Stämme bestehen aus einer Mischung von Varianten hinsichtlich ihres zytopathischen Effekts. So wurden große flache Riesenzellen (fR-Typ) mit hunderten von Kernen und daneben kleinere Riesenzellen (rR-Typ) beobachtet, die sich zunächst wie der fR-Typ entwickelten, dann aber in zahlreiche abgekugelte Untereinheiten zerfielen (KOHLHAGE 1961, KOHLHAGE u. SIEGERT 1962). Beide Varianten des Herpes-simplex-Stammes erwiesen sich als genetisch fixiert.

Cytologische Untersuchungen von Zellkulturen, die mit "Riesenzell-Viren" infiziert sind, zeigten charakteristische Veränderungen sowohl im Kern als auch im Cytoplasma. Die ersten lichtmikroskopischen Erscheinungen werden im Kern beobachtet. Der Nukleolus verdichtet sich zunächst unter Verlust seiner Innenstruktur, wird zusehends kleiner und ist schließlich nicht mehr nachweisbar. Etwa gleichzeitig ballt sich das Chromatin zu feinen Körnchen zusammen (LEBRUN 1956). Diese Verklumpung des Chromatins verstärkt sich ständig und endet mit seiner Verlagerung an die Kernmembran (MORGAN et al. 1953, 1954). Autoradiographische Untersuchungen ergeben, daß vor der Infektion eingebautes H³-Thymidin vermehrt am Kernrand auftritt, während man nach der Infektion zugeführte Markierungssubstanz in der Kernmitte wiederentdeckt. Hieraus schloß man, daß die Zell-DNS durch die Vorgänge der Virusvermehrung an die Kernmembran gedrängt wird (NII et al. 1961, KAPLAN et al. 1963, MUNK et al. 1964). Etwa zur 8. Stunde p. i. wird das Kerninnere zunehmend homogen. Fixiert man die Zellen zwischen 10 - 15 Stunden p. i. mit Bouinscher-Lösung, so sieht man Einschlüßkörperchen des Typ A. Da man sie nach Fixierung mit Osmiumsäure oder mit anderen Fixativa nicht beobachtet, müssen die Einschlüßkörperchen als Fixierungsartefakte aufgefaßt werden, die entstehen, wenn bereits der größte Teil der Virus-DNS gebildet ist und sich außerhalb des Kerns befindet (CROUSE et al. 1950).

Über die Entstehung virusbedingter Riesenzellen bestanden lange Zeit verschiedene Auffassungen. Einerseits wurden amitotische Kernteilungen als Ursache angenommen (RIVERS, HAAGEN, MUCKENFUSS 1929), andererseits eine Zellverschmelzung für wahrscheinlich gehalten (ROSS u. ORLANS 1958).

Mikrokinematographische Untersuchungen ergaben dann, daß Riesenzellen durch "Zytophagie" entstehen (LEPINE et al. 1959). Dieser Vorgang wurde von FALKE u. RICHTER (1961) an mit B-Virus infizierten Kulturzellen genauer untersucht. Demnach senden Herpes-infizierte Zellen zuerst "Plasmazungen" aus, die sich an nichtinfizierten, normalen Zellen ihrer Umgebung anheften. Diese Plasmaverbindungen verbreitern sich ständig, bis nach 20 - 40 Minuten die Verschmelzung vollendet ist. Die Kerne können nun in die Riesenzelle hinüberwandern.

3. Hemmstoffe der Virusvermehrung

Das Virus ist als obligater Zellparasit vom Stoffwechsel seiner Wirtszelle abhängig. Von einer großen Zahl von Hemmstoffen können jedoch nur wenige in vitro und in vivo benutzt werden, da die Differenz zwischen Dosis toxica und curativa zu gering ist, um ohne Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels eine sichere Hemmung der Virussynthese zu gewährleisten.

Jod-Desoxyuridin besitzt als Antimetabolit mehrere Angriffspunkte innerhalb des Zellstoffwechsels. Einerseits wird durch seine Anwesenheit die Umwandlung von Uridindesoxymonophosphat in Thymidin-monophosphat verhindert (DELAMORE u. PRUSOFF 1962), andererseits die enzymatische Benutzung des Thymidins für die Virus-DNS-Synthese gehemmt (ROIZMAN et al. 1963).

Das halogenierte Aminosäuren-Analoge para-Fluorphenylalanin, ein Antimetabolit des Phenylalanins, verhindert ebenso wie das Jod-Desoxyuridin, die Vermehrung animalischer Viren. Durch seinen Einbau in das Protein verschiedener Enzyme wird deren Funktion gestört. Dadurch entsteht in Abhängigkeit von der Konzentration eine Hemmung des Zellstoffwechsels. Deswegen wird auch die Virus-Synthese beeinträchtigt.

Proflavin hemmt sowohl die Nukleinsäure als auch die Proteinsynthese. Es bildet sich ein "DNS-Proflavin-Komplex" aus, der dadurch charakterisiert ist, daß zwischen zwei Basenpaare der DNS-Doppelhelixfäden ein Molekül Proflavin einge-

lagert wird (LERMAN 1963). Hierdurch wird die Übertragung der genetischen Information auf die Botschafter-RNS verhindert. Als weitere Folge wird die Entstehung von Proteinen gehemmt.

Mit geringen Konzentrationen von Phenyl-Äthylalkohol (0,1%) läßt sich eine reversible Hemmung des Herpes-simplex-Virus erzielen (ROIZMAN 1963). Eine 0,3%ige Phenyl-Äthylalkohol-Lösung führt jedoch zu einer irreversiblen Hemmung.

Actidion ist ein Antibiotikum, welches 1946 als Nebenprodukt bei der Herstellung von Streptomycin entdeckt wurde.

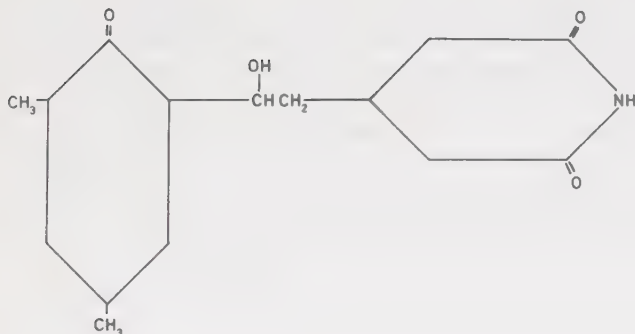


Abb. 1: Strukturformel von Actidion

Es hat einen weiten Wirkungsbereich. Seine wachstumshemmende Wirkung erstreckt sich auf bestimmte Myzeten und Protozoen, jedoch kaum auf Bakterien (LATUASAN et al. 1958). Auch bei einigen experimentellen Tiertumoren ist es wirksam. Eingehende Untersuchungen über seine Wirkungsweise haben BENNETT et al. (1964) an HEP-2- und Mäuse-Adenokarzinomzellen 755 durchgeführt. In diesen Zellen wurde eine deutliche Einbau-Hemmung von Vorläufersubstanzen in die DNS festgestellt. Betroffen waren vor allem Basen und Nukleoside sowie Glycin und Formiat. Die beiden letzteren Verbindungen wurden jedoch nur kurzfristig nicht für die RNS-Synthese verwendet. Dagegen war die Proteinneubildung vollständig gehemmt. Verschiedene Kinasen und die DNS-Polymerase wurden nicht beeinflußt. DNS und Proteinsynthese wurden gleichzeitig und prompt blockiert. Wie Actidion diese Wirkungen auslöst, ist unbekannt.

4. Chemotherapeutische Verwendung von Hemmstoffen

Seit kurzem werden Antimetabolite zur ärztlichen Behandlung der Herpes-simplex-Keratokonjunktivitis verwendet. Bei diesen Stoffen handelt es sich um Inhibitoren bestimmter Synthesevorgänge in der Zelle, insbesondere um diejenigen der Nukleinsäure- und Proteinsynthese. Sie wurden zunächst experimentell in vitro untersucht, da sich die Vorgänge dort am besten überblicken lassen und kamen dann am Versuchstier zur Anwendung. Eine spezifische Therapie der Keratitis herpetica erschien möglich, nachdem festgestellt worden war, daß die in vitro erprobten Hemmsubstanzen ihre Wirkung auch in vivo beibehalten.

WOLLENSAK (1961) führte 1959 zum ersten Male eine lokale Therapie des Herpes corneae mit Antimetaboliten am Menschen durch. Zur Anwendung kamen das Aminosäureanaloge para-Fluorphenylalanin und Proflavin. Von 14 mit para-Fluorphenylalanin behandelten Patienten wurden 12 in kurzer Zeit geheilt. Eine ähnlich günstige Wirkung zeigte Proflavin. Mit ihm konnten 21 von 29 Patienten geheilt werden. Bei beiden Substanzen erwies es sich als notwendig, möglichst

frühzeitig mit der Behandlung zu beginnen und diese genügend lange durchzuführen, da sonst Rezidive auftreten.

1962 berichtete KAUFMAN et al. über die therapeutische Wirkung von 5 - Jod - 2 - desoxy - Uridin. Die Behandlungserfolge waren im allgemeinen auch bei diesem Präparat gut, jedoch ließen sich tiefgehende Cornealprozesse - wie auch bei para-Fluorphenylalanin - nur schlecht beherrschen, so daß man auf die herkömmlichen Behandlungsmethoden zurückgreifen mußte.

Von den Nebenwirkungen des Jod - Desoxyuridin weiß man, daß es teratogen wirkt (MURPHY 1960). Dem Proflavin spricht man eine mutationsauslösende Wirkung zu (RÖHRBORN 1960). Lediglich das para-Fluorphenylalanin soll von derartigen Nebenwirkungen frei sein (WOLLENSAK 1963).

Antivirale Eigenschaften des Actidion wurden von HAFF (1964) gegenüber einer Vielzahl von Viren beobachtet. Unter anderem konnte die Vermehrung des Pseudotollwut-Virus in Kaninchen-nieren-Zellkulturen während der ersten 4 Stunden p. i. verhindert werden. - Bisher sind jedoch noch keine Berichte über die Anwendung von Actidion auf die Synthese des Herpes-simplex-Virus in vitro bekannt geworden. Es wurde deshalb sein Einfluß auf die verschiedenen Stadien der Vermehrung des Herpes-simplex-Virus untersucht, um festzustellen, ob es sich für eine Behandlung der Keratitis herpetica des Kaninchens eignet.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Virus

Für alle Versuche wurde die fR-Variante des Herpes-simplex-Stammes "JES" (KOHLHAGE u. SIEGERT 1962) verwendet. Der Stamm hatte 24 Passagen in HeLa-Zellkulturen und 63 Passagen in Kaninchennieren-Zellkulturen durchlaufen. Das Virus wurde in Kaninchennieren-Zellkulturen in Gegenwart von Eagle's-Basalmedium gezüchtet und nach dem Auftreten eines vollständigen zytopathischen Effekts geerntet. Die virus-haltige Kulturflüssigkeit zentrifugierten wir 10 Minuten bei 3000 UpM und nahmen den Überstand ab. Das Zellsediment wurde in einem Glaskugelhomogenisator (Firma Bühler, Tübingen) aufgeschlossen und anschließend nochmals zentrifugiert. Beide Überstände sind dann zusammengegeben, in kleine Portionen abgefüllt und bei -70°C aufbewahrt worden. Die Virussuspensionen enthielten 2×10^4 bis 2×10^5 plaque-bildende Einheiten/0,2 ml.

2. Zellkultur

Die Herstellung der Kaninchennieren-Zellkulturen erfolgte nach der von DULBECCO u. VOGT (1954) angegebenen Methode. Die Nieren etwa 6 - 13 Tage alter Kaninchen wurden entfernt und unter sterilen Bedingungen mit der Schere zerkleinert. Nach 2-maligem Waschen mit "Lahn"-Medium (Hanks-Lösung mit 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat) kamen die Nierenstückchen zur enzymatischen Aufschließung mit 50 ml einer auf 37°C erwärmten Trypsinlösung in einen Erlmeyerkolben. Ein Magnetrührer sorgte für die Beschleunigung des Vorganges. Die gewonnene Suspension aus Einzelzellen und kleinen Zellaggregaten wurde dann zur Beseitigung größerer Gewebstücke durch eine Gazeschicht filtriert, die Enzymwirkung im Eisbad gestoppt, und die Zellen in der Zentrifuge ausgeschleudert. Nach erneutem Waschen mit "Lahn"-Medium kamen die abzentrifugierten Zellen in Wachstumsmedium (Hanks-Lösung 89%, Kälberserum 10% und 1% Lactalbumin-Hydrolysat unter Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Nystatin. Den pH-Wert

stellten wir mit einer 2,8%igen Natriumbikarbonat-Lösung auf 7,2 ein.). Zur Anzüchtung einer Kultur wurden etwa 200.000 Zellen/1,2 ml Medium in jedes Rollrandröhrchen gegeben. Nach 4-tägiger Inkubation bei 37 ° C hatte sich ein gleichmäßiger Zellrasen am Glasboden des Röhrchens gebildet. Die Kultur wurde nach dieser Zeitspanne 2 x mit "Lahn"-Medium gewaschen, dann mit Erhaltungsmedium (95 % Basalmedium nach EAGLE und 5 % einer 2,8%igen Na HCO_3^- -Lösung mit Antibiotika) versehen und für die Versuche verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte, wenn der pH-Wert unter 7,0 absank.

3. Virustitration

Zur Bestimmung der Zahl der infektiösen Viria bedienten wir uns der Plaque-Methode nach FARNHAM (1958). Die Virus-suspensionen wurden in Zehnerstufen verdünnt, und von jeder Verdünnungsstufe 0,2 ml auf je 2 - 3 Röhrchen verimpft. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 ° C wurden die entstandenen Plaques mikroskopisch ausgezählt. Die Stärke des zytopathischen Effekts bezeichneten wir mit den Werten von 4 + = 100%ige; 3 + = 75%ige; 2 + = 50%ige; 1 + = 25%ige Zerstörung des Zellrasens.

4. Zellfärbung mit Acridin-orange

Die Fixierung der auf Deckgläsern in Petrischälchen gewachsenen Zellkulturen, die sich in Begasungsrohren nach SCHWÖBEL et al. (1957) befanden, wurde mit Carnoy's-Lösung vorgenommen. Die Einwirkungszeit betrug 5 Minuten bei einer Temperatur von 4 ° C. Die Acridin-orange-Färbung (Acridin-orange; Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim) erfolgte durch eine 0,01%ige Lösung für die Dauer von 10 Minuten. Ihr pH-Wert war mit Mc Ilvaine-Puffer auf 4,0 eingestellt worden. Vor und nach der Färbung wurden die fixierten Zellen mit demselben Puffer etwa 30 Minuten lang gewaschen und die Deckgläser sofort unter das Fluoreszenzmikroskop gebracht, da die Intensität der Färbung schnell nachließ. Die DNS fluoreszierte grün; die RNS rot oder gelb.

5. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluorochromierten Zellen wurden unter Verwendung der Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200 W in Verbindung mit dem Laborlux-Mikroskop der Firma E. Leitz (Wetzlar) beobachtet. Als Erregerfilter dienten der UG 1 und NG 1. Zur Photographie wurde der Agfa-CK 20 Film verwendet.

6. Hemmstoffe

Für jedes Experiment wurden frisch angesetzte Lösungen benutzt. Das Lösungsmittel der Hemmstoffe war ein isotonischer NaCl-Kaliumphosphatpuffer mit dem pH-Wert von 7,2. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

Actidion (The Upjohn Company, Kalamazoo, Mich., U.S.A.): Eine Stammlösung von 25 mg/5 ml wurde zu 1 : 10, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12.800, 25.600 verdünnt und 0,2 ml dem Kulturmedium (1,2 ml) zugesetzt. Dadurch entstanden Konzentrationen von 71,4 μ g bis 0,03 μ g/ml Medium.

Para-Fluorphenylalanin (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, U.S.A.): 142 μ g/ml Medium.

Proflavin-HCl (Nutr. Biochem. Corp. Cleveland, Ohio, U.S.A.): 0,5 μ g/ml Medium.

C. ERGEBNISSE

1. Virusvermehrung

Eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung der nachfolgenden Hemmexperimente waren zunächst normale Vermehrungsversuche in dem gewählten Virus-Zellkultursystem. Hierdurch sollten Anhaltspunkte gewonnen werden über den Zeitpunkt der ersten Zellveränderungen, ihre Weiterentwicklung, sowie über den Beginn und Verlauf der Neubildung infektiöser Viria.

Wir infizierten die etwa 200.000 Zellen umfassenden Rasen⁵ der Kulturröhrchen mit Volumina von je 0,2 ml, die 2×10^5 plaquebildende Einheiten enthielten, mit einer Multiplicity von 1. Die Kulturen wurden daraufhin bei 37°C inkubiert. Da nach Angaben von KAPLAN (1957) die Adsorption innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Inokulation des Saatvirus nahezu abgeschlossen ist, wurden die Zellen nach dieser Zeit mehrmals mit Erhaltungsmedium gewaschen, um nicht adsorbierte Viria zu beseitigen. Nach weiterer Inkubation ist die Zahl der neu gebildeten infektiösen Viruspartikel stündlich bei Stichproben (2 Röhrchen) geprüft und gleichzeitig die Stärke des zytopathischen Effekts bestimmt worden.

Der Anstieg der Infektiosität ließ einen für das riesenzellbildende Herpes-simplex-Virus charakteristischen Verlauf erkennen (Abb. 2). Von der 5. bis 18. Stunde stieg der Virus-titer nahezu exponentiell um zwei Zehnerpotenzen; danach blieb er konstant. Die Entwicklung von Riesenzellen begann etwas früher als die Virusneubildung. In 5 weiteren Stunden hatten sie den gesamten Zellrasen erfaßt. 9 bis 10 Stunden nach der Infektion riß schließlich der Zellrasen auf.

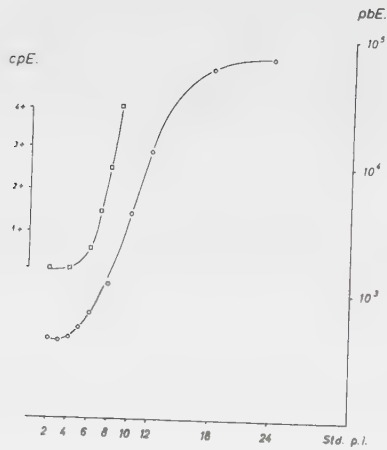


Abb. 2: Riesenzellbildung (cpE) und Neubildung infektiöser Teilchen (pbE) in Kaninchennierenzellen nach der Infektion mit einer Multiplicity von 1 (□ - □ : zytopathischer Effekt; o - o : Infektiosität).

2. Der Einfluß von Actidion auf die Vermehrung des Herpes-simplex-Virus

a) Die Toxizität von Actidion gegenüber Kaninchennieren-Zellkulturen

Eine weitere Voraussetzung für Hemmversuche war die Untersuchung der zytotoxischen Wirkung des Actidion auf die Kulturzellen und die Ermittlung der nichttoxischen Grenzkonzentrationen (Abb. 3).

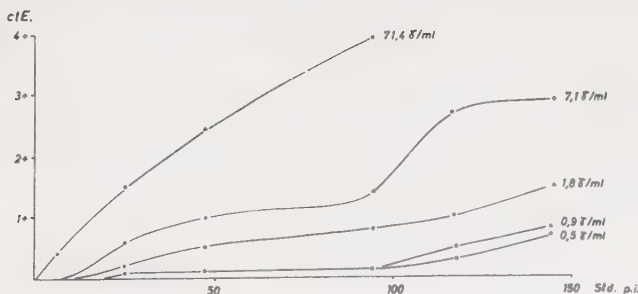


Abb. 3: Der zytotoxische Effekt (ctE) verschiedener Actidion-Konzentrationen auf Kaninchennierenzellen in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung.

Der toxische Effekt äußerte sich mikroskopisch darin, daß sich einzelne Zellen unter deutlicher Verminderung ihrer Größe abkugelten und von der Glaswand lösten. Die übrigen Zellen unterschieden sich von den normalen durch ein "glasiges" Aussehen; ihre Konturen wurden undeutlich.

Bei einer Konzentration von $71,4 \delta/\text{ml}$ Medium waren etwa 10 % der Zellen bereits nach 6 Stunden in jedem Kulturröhrchen, und nach 4 weiteren Tagen alle Zellen abgekugelt. Innerhalb derselben Zeit (4 Tage) schädigte die Dosis von $7,1 \delta/\text{ml}$ - soweit morphologisch erkennbar - etwa 30 % der Zellen. Dieser Anteil stieg jedoch nach weiteren 48 Stunden auf 75 % an. Eine Konzentration von $1,8 \delta/\text{ml}$ Medium zerstörte nach 48 Stunden 10 %, nach 6 Tagen 35 % der Zellkultur. Fast ohne erkennbare Schädigung wurden hingegen Konzentrationen von $0,9 \delta/\text{ml}$ und $0,5 \delta/\text{ml}$ Medium vertragen. Die Zellen waren nach 4 Tagen lediglich etwas "glasig".

b) Der Einfluß von Actidion auf freies Virus

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob infektionstüchtige Viria in Suspension durch Actidion bei direkter Einwirkung inaktiviert werden, wurden Dosen von $1,2 \delta$ und 5δ in jeweils 0,4 ml Medium mit Virus (2×10^5 pbE in 0,2 ml) 8 Stunden bei 37°C inkubiert und zugleich mit entsprechenden unbehandelten Kontrollen austitriert. Die Infektiositätstiter zeigten hierbei keine nennenswerten Abweichungen, so daß eine Schädigung der Virusteilchen ausgeschlossen werden konnte (Tab. 1).

Tab. 1

	vor Behandlung	nachher
Kontrolle:	Virus (2×10^5 pbE) + NaCl-K-Phosphatpuffer 0,4 ml /0,2 ml	$2,7 \times 10^4$ pbE /0,2 ml
Versuch 1:	Virus (2×10^5 pbE) + 5δ Actidion /0,2 ml /0,4 ml	$3,5 \times 10^4$ pbE /0,2 ml
Versuch 2:	Virus (2×10^5 pbE) + $1,2 \delta$ Actidion /0,2 ml /0,4 ml	$2,2 \times 10^4$ pbE /0,2 ml

c) Dosiswirkungs-Kurve

Charakteristische Beziehungen ergaben sich zwischen der Actidionkonzentration und dem Virusgehalt infizierter Zellen (Abb. 4).

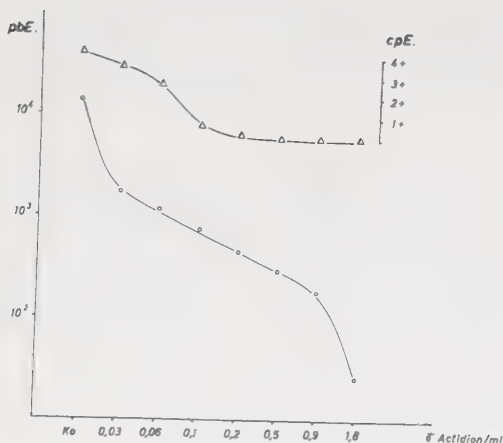


Abb. 4: Dosiswirkungs-Kurve. Der Einfluß abgestufter Mengen von Actidion auf die Riesenzellbildung und die Neubildung infektiöser Viria (11 Stunden p. i.). ($\Delta - \Delta$: zytopathischer Effekt; o - o : Infektiosität)

Bei diesbezüglichen Versuchen wurden Kaninchennieren-Zellkulturen infiziert und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Auswaschen der Kulturen kamen abgestufte Mengen Actidion hinzu (71,4 μ /ml bis 0,03 μ /ml Medium). Dann wurden die Röhrchen weiter inkubiert. Sobald die Kontrollen zu 100 % zerstört waren, was nach 11 Stunden der Fall war, wurden die zytopathischen Effekte der Versuchskulturen bestimmt und die Röhrchen bei - 70°C eingefroren, bis die Auswertung des Virusgehaltes erfolgte.

Mit einer Konzentration von $1,8 \times 10^{-6}$ /ml konnten sowohl die Virusvermehrung als auch der zytopathische Effekt vollständig verhindert werden; bei geringeren Konzentrationen von $0,9 \times 10^{-6}$ /ml oder $0,5 \times 10^{-6}$ /ml wurden der zytopathische Effekt vollständig und die Virusneubildung noch weitgehend unterdrückt. Noch kleinere Dosen ($0,1 \times 10^{-6}$ - $0,03 \times 10^{-6}$ /ml) konnten die Ausbildung des zytopathischen Effekts nicht mehr verhindern, jedoch blieb die neugebildete Infektiosität noch deutlich reduziert.

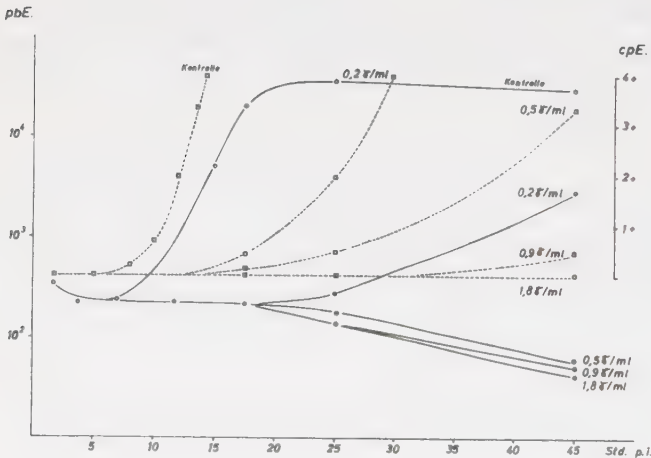


Abb. 5: Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Actidion auf die Riesenzellbildung und Neubildung infektiöser Partikel im Verlauf von 45 Stunden (□ ---- □ : zytopathischer Effekt; o - o : Infektiosität).

Es läßt sich also feststellen, daß geringe Konzentrationen von Actidion die Bildung infektiöser Viruspartikel stärker beeinflussten als den zytopathischen Effekt. Diese Dissoziation zwischen zytopathischem Effekt und Neubildung infektiöser Viria wurde noch deutlicher erkennbar, wenn die Versuchsdauer auf 45 Stunden ausgedehnt wurde (Abb. 5).

d) Zytologische Untersuchungen

Die unter dem Einfluß von Actidion eintretenden morphologischen Veränderungen infizierter und nicht infizierter Kaninchennierenzellen wurden mit der Acridin-orange-Färbung verfolgt, um festzustellen, ob Änderungen in der Anordnung von DNS und RNS innerhalb der Zelle erfolgen.

Hierzu wurden in Petrischälchen auf Deckgläsern gewachsene Kaninchennierenzellen infiziert und nach 2 Stunden die nicht adsorbierten Viria durch mehrmaliges Waschen entfernt. Danach kam Actidion in Konzentrationen von 1,8 μ /ml bzw. 0,9 μ /ml hinzu; ebenso wurden die gleichen Actidiondosen zu nicht infizierten Kulturen hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Färbung der behandelten Zellen zusammen mit den gleichzeitig angesetzten Kontrollen, die aus unbehandelten normalen und infizierten Zellen bestanden.

Der infizierte Zellrasen war, wenn er nicht mit Actidion versehen wurde, nach 24 Stunden völlig zerstört und hatte sich weitgehend vom Glasboden losgelöst. Lediglich vereinzelt Riesenzellen waren noch der Beobachtung zugänglich. Die Kerne zeigten randständiges Chromatin. Das Zytoplasma der Zellen war kaum noch sichtbar, die Nukleoli waren verschwunden.

Mit Actidion beschickte Kulturen verhielten sich nahezu identisch mit den unbehandelten Zellkontrollen, wenn Konzentrationen von 0,9 μ /ml Medium und darunter benutzt wurden. Der Zusatz höherer Konzentrationen führte jedoch zu Änderungen der Zellgestalt. Es handelte sich hierbei um die schon erwähnte toxisch bedingte Abkugelung und Schrumpfung der Zellen, sowie um eine starke Reaktion der Kerne, die ihren Ausdruck in zahlreichen tiefen Einbuchtungen der Kernmembran fand. Die Einschnürungen konnten soweit gehen, daß 4 bis 6 Kernteile nur durch dünne Karyoplasmabrücken verbunden waren (Abb. 7, links unten) und sich schließlich

zu verschieden großen, kugeligen Gebilden umwandelten. Außerdem erschien das Karyoplasma gelblich-weiß granuliert.

Die unter dem Einfluß von Actidion infizierten Zellkulturen stimmten in ihrem Aussehen mit den unbehandelten Actidion-Kontrollen überein, das heißt, es traten wiederum Einkerbungen der Kerne auf, die teilweise zur Abschnürung kugelförmiger Gebilde führten. In anderen Zellen war das Karyoplasma granuliert (Abb. 10, rechts Mitte) und gelblich-fluoreszierendes Material diffus verteilt. Die meisten Zellen blieben nahezu unverändert.



Abb. 6: Normale Kaninchennierenzellen,
240 x, Acridin-orange-Färbung.
Zytoplasma rötlich gefärbt;
Chromatinsubstanz grün;
Nukleoli gelb.

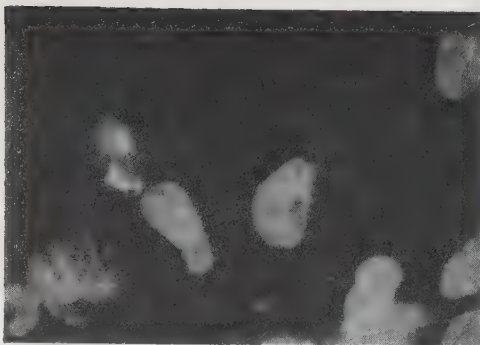


Abb. 7: Nichtinfizierte, mit Actidion behandelte Kaninchennierenzellen nach 24 Stunden; 600 x; Acridin-orange-Färbung. Links unten Kern mit tiefen Einschnürungen.

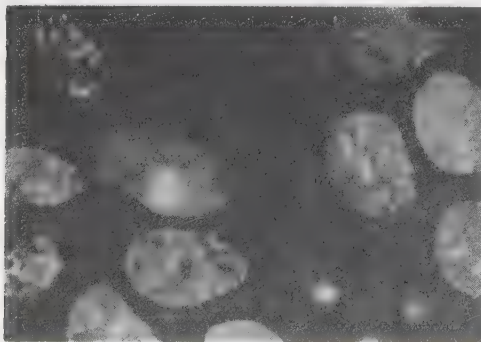


Abb. 8: Mit Herpes-simplex-Virus infizierte Kaninchennierenzellen 24 Stunden p.i.; 600x; Acridin-orange-Färbung. Ausschnitt aus einer Riesenzelle. Kerne vergrößert. keine Nukleoli mehr sichtbar; Plasma nicht fluoreszierend; Chromatin randständig; Karyoplasma hyalin oder granuliert.

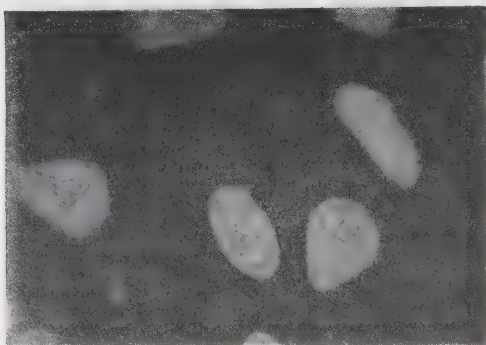


Abb. 9: Mit Herpes-simplex-Virus infizierte und mit Actidion behandelte (0,90 µ/ml) Kaninchennierenzellen, 24 Stunden p. i.; 600 x; Acridin-orange-Färbung. Normale Kerne.

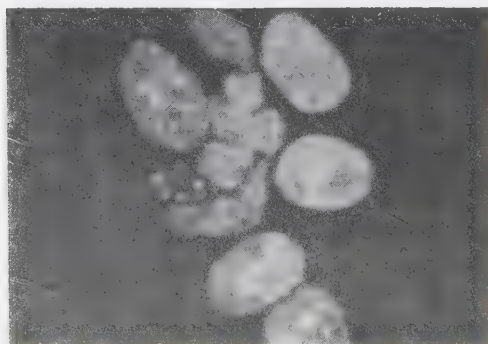


Abb. 10: Mit Herpes-simplex-Virus infizierte und mit Actidion (0,5 µ/ml) behandelte Kaninchennierenzellen, 24 Stunden p.i.; 600 x; Acridin-orange-Färbung. Abnormale Kernteilungen mit anfänglichen Veränderungen Herpes-infizierter Zellen.

e) Der Einfluß von Actidion auf Adsorption und Penetration

Der erste Schritt des Synthesesyklus des Herpes-simplex-Virus besteht in seiner Adsorption an die Zelloberfläche. Während dieser Phase ist das Virus noch durch Immenserum neutralisierbar. Wird es jedoch durch Viroplexis von der Zelle aufgenommen (WATSON et al. 1963, SIEGERT u. FALKE 1963), so ist es für neutralisierende Antikörper nicht mehr erreichbar.

Um zu erfahren, ob Actidion einen Einfluß auf die Adsorption hat, wurden zahlreiche Kulturen mit etwa 50 plaquebildenden Einheiten infiziert und gleichzeitig mit Hemmstoff versehen. Innerhalb der ersten 2 Stunden p.i. wurde das Erhaltungsmedium mehrerer Kulturröhrchen in kurzen Abständen entnommen und der darin verbliebene Virusgehalt geprüft.

Das Ergebnis ließ keinen Einfluß auf die Adsorptionsphase erkennen.

Um die Penetration des Virus zu verfolgen, wurde der Einfluß der Actidionwirkung im Verlauf der ersten 2,5 Stunden nach Infektion beobachtet (Abb. 11).

Kulturen wurden hierzu mit 50 plaquebildenden Einheiten/0,2 ml Basalmedium nach EAGLE infiziert; ein Teil erhielt gleichzeitig Actidiondosen von jeweils 0,90 μ /ml. Weitere Kulturen hatten Actidion bereits eine Stunde vor der Inokulation erhalten. In Abständen von 15 bzw. 30 Minuten fügten wir Herpes-Kaninchen-Immenserum in der Verdünnung von 1 : 20 hinzu, wodurch freies und kurz vorher adsorbiertes Virus neutralisiert wurde. Nach 150 Minuten wurden die Kulturen viermal gewaschen, um das Actidion zu beseitigen. 24 Stunden p.i. lasen wir die entstandenen Plaques ab.

Innerhalb der ersten 45 Minuten wiesen alle drei Versuchsserien gleiche Werte auf, in der folgenden Zeit zeigten jedoch die Kontrollen wesentlich höhere Plaquezahlen als die Actidion-haltigen Röhrchen (Abb. 11). Die größte Differenz wurde 60 Minuten p. i. abgelesen, sie betrug etwa 40 %. Schließlich wurde Actidion eine Stunde vor der Infektion dazugegeben. Die aus dieser Anordnung erhaltenen Werte unterschieden sich nicht von denen nach der Zugabe von Actidion zum Zeitpunkt der Infektion.

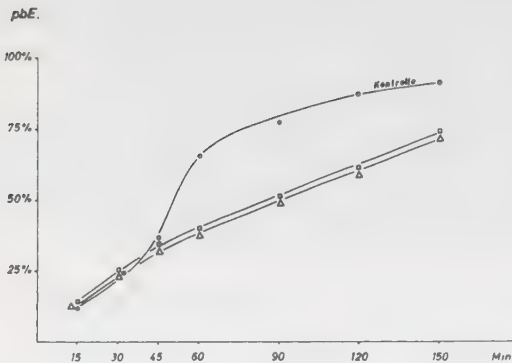


Abb. 11: Der Einfluß des Actidion (0,90 γ /ml) auf die Penetration des Herpes-simplex-Virus (o - o : Viruskontrolle; □ - □ : Actidion-Zusatz zum Zeitpunkt der Infektion; Δ - Δ : Actidion-Zusatz 1 Stunde vor der Infektion).

f) Zeitliche Beziehungen zwischen der Zugabe von Actidion und der Hemmung des zytopathischen Effektes sowie der Entstehung infektiöser Viria

Um die Wirkung von Actidion auf den zeitlichen Ablauf der Vermehrung des Herpes-simplex-Virus zu bestimmen, gaben wir Actidion in der Konzentration von 0,90 γ /ml Medium zeitlich abgestuft auf vorher infizierte Kulturen. Der Versuch wurde beendet und ausgewertet, wenn in den Kontrollen ein vollständiger zytopathischer Effekt vorlag.

Die Hemmsubstanz brauchte dazu nicht entfernt zu werden, da sie durch Titration ausverdünnt wurde. Innerhalb dieses Ein-Schritt-Vermehrungszyklus unterdrückt Actidion die Virusvermehrung und den zytopathischen Effekt vollständig, wenn es bis zur 3. Stunde p. i. (einschließlich) zugesetzt wird. Eine Zugabe zur 5. Stunde verhinderte die Riesenzellbildung nur noch unvollständig. Bei späterer Zugabe wurde der Effekt zunehmend geringer. Nach der 7. Stunde p. i. war der zytopathische Effekt überhaupt nicht mehr beeinflussbar, während die Infektiosität bis zur 7. Stunde p. i. noch deutlich gehemmt wurde. Nach diesem Zeitpunkt nahm die Hemmbarkeit schnell ab (Abb. 12).

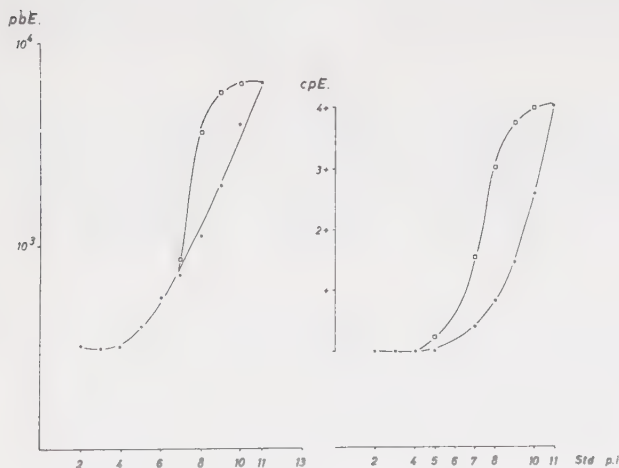


Abb. 12: Die Hemmbarkeit des zytopathischen Effektes und der Bildung infektiöser Viruspartikel in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Actidion-Zugabe (0,90 μ /ml). Zum Zeitpunkt des vollständigen zytopathischen Effektes (11.Std.p.i.) der Kontrollkulturen wurde der zytopathische Effekt (li.Kurve) und die Infektiosität (re.Kurve) der mit Actidion behandelten Kulturen gemessen und den stündlich bestimmten Kontrollwerten (o - o) gegenübergestellt.

g) Das "Überleben" von infektiösem Virus in den Zellen unter der Wirkung von Actidion

Bestimmte Dosen von Actidion hemmen über mehrere Stunden die Vermehrung des Herpes-simplex-Virus, wie die Dosiswirkungsversuche gezeigt haben. Es mußte deshalb die Frage untersucht werden, ob dies auch über größere Zeitspannen hinweg möglich ist, und wie lange sich vermehrungsfähiges Virus in den Zellen nachweisen läßt.

Es wurden Kaninchennieren-Zellkulturen mit Virus infiziert, nach 2 Stunden mit Erhaltungsmedium gewaschen und danach mit Actidion (0,90/ml) versehen. Jeden 2. Tag wurde das den Hemmstoff enthaltende Medium erneuert. In Abständen von 24 Stunden entfernten wir das Actidion durch mehrmaliges Waschen jeweils bei einigen Röhrchen und verfolgten den zytopathischen Effekt sowie die Neubildung infektiösen Virus (Abb. 13).

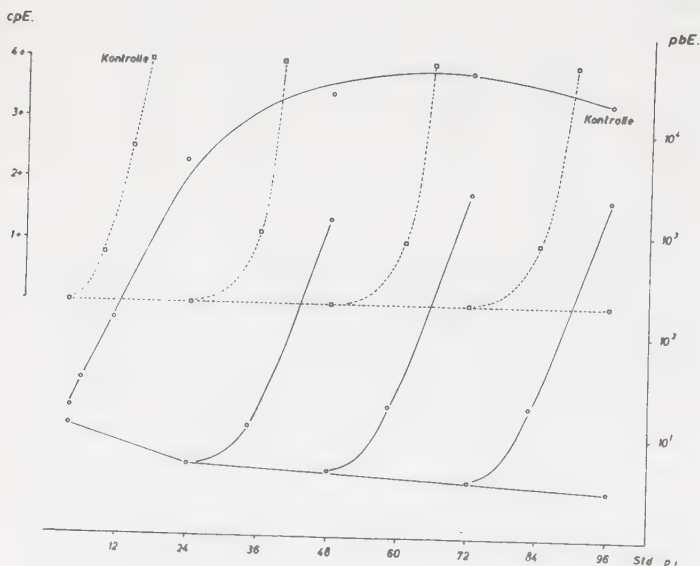


Abb. 13: Das "Überleben" von infektiösem Virus in Kaninchennierenzellen unter Einwirkung von Actidion. In Abständen von je 24 Stunden wurde Actidion beseitigt. (□ - □ : zytopathischer Effekt; o - o : Infektiosität)

Aus dieser Abbildung geht hervor, daß der Virusgehalt der Zellen unter dem Einfluß von Actidion im Verlauf einer großen Zeitspanne fast unverändert blieb, und ein zytopathischer Effekt nicht auftrat. Nach Entfernung des Hemmstoffs setzte die normale Vermehrung wieder ein, ähnlich wie in den Kontrollen, jedoch etwas verzögert nach einer Latenzphase. Dieses Verhalten wurde bis zum 6. Tage p. i. beobachtet.

3. Der Einfluß von Hemmstoffkombinationen auf die Virusvermehrung

Weitere Versuche sollten zeigen, ob eine Kombination von Hemmstoffen verschiedener Wirkungsmechanismen eine Verstärkung der Hemmung bewirkt. Es wurden para Fluorphenylalanin bzw. Proflavin in Kombination mit Actidion geprüft. Wir wählten Konzentrationen der Substanzen an der unteren Grenze der Hemmwirkung.

Eine größere Zahl von Zellkulturen wurde infiziert und nach 2 Stunden gewaschen; anschließend versahen wir sie mit Hemmstoffkombinationen : Actidion (0,2 μ /ml) + para-Fluorphenylalanin (142,8 μ /ml) und Actidion (0,2 μ /ml) + Proflavin (0,5 μ /ml). Entsprechende Kontrollen wurden allein mit Virus, Actidion, Proflavin und para-Fluorphenylalanin angesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C.

Der Vergleich der Titerwerte in Abb. 14 läßt erkennen, daß die mit para-Fluorphenylalanin und Proflavin behandelten Zellkulturen gegenüber den unbehandelten Viruskontrollen nur wenig gehemmt waren. Dagegen zeigten die mit Actidion bzw. den Kombinationen versehenen Kulturen zunächst vollständige Hemmung. Erst nach 30 Stunden begann die Riesenzellbildung, und die Zahl der infektiösen Viria stieg an. Es traten dann zunehmend Unterschiede hinsichtlich der Menge neugebildeten Virus auf, die auf eine unterschiedliche Hemmwirkung der Kombinationen und Actidion allein hinwiesen. Bezüglich des zytopathischen Effektes waren dagegen keine Differenzen feststellbar. Nach 48 Stunden sah man deutlich, daß die Hemmwirkung des Actidion in Kombination mit para-Fluorphenylalanin gegenüber der Neubildung der Viria stärker war, als die der einzelnen Präparate allein. Einen ähnlichen, wenn auch schwächeren Effekt erzielte das mit Actidion kombinierte Proflavin. Addiert man die Plaquewerte der Kontrollen, so erhält man die Werte der Kombinationen.

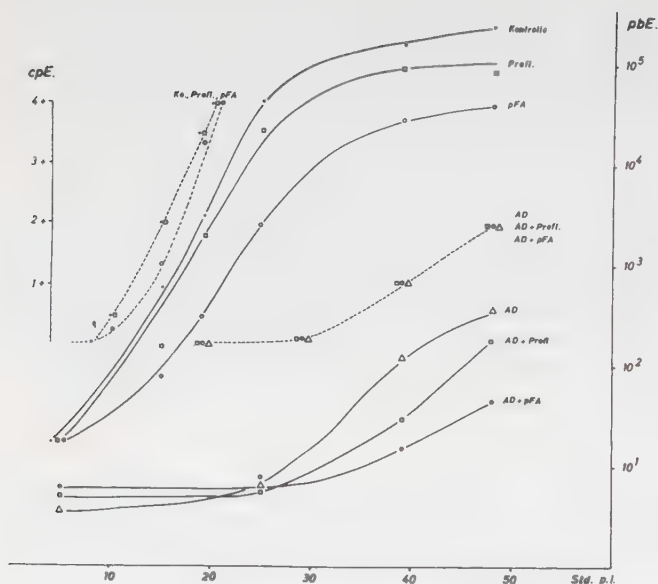


Abb. 14: Die Hemmwirkung einzelner und kombinierter Hemmstoffe auf die Entstehung infektiöser Viria. (Actidion (AD) : 0,20 δ /ml; Proflavin (Profl) : 0,50 δ /ml; para-Fluorphenylalanin (pFA): 142,0 δ /ml). Unterbrochene Linien = zytopathische Effekte; ausgezogene Linien = Virustiter.

Der zytopathische Effekt der Kontrollen hatte nach schon 20 Stunden den gesamten Rasen erfaßt; bei den Kombinationen war nach 48 Stunden erst die Hälfte des Rasens in Riesenzellen umgewandelt.

In gleichartigen Versuchen änderten wir die Zusammensetzung des Erhaltungsmediums. Dieses bestand lediglich aus Basalmmedium nach FABLE. Die Kurvenverläufe lassen bei Fehlen des Lactalbumin-Hydrolysats eine stärkere Hemmung der Infektiosität durch para-Fluorphenylalanin erkennen. Bereits nach

48 Stunden konnte unter der Wirkung des Actidion, kombiniert mit para-Fluorphenylalanin, kein infektiöses Virus mehr in der Kultur nachgewiesen werden (Abb. 15).

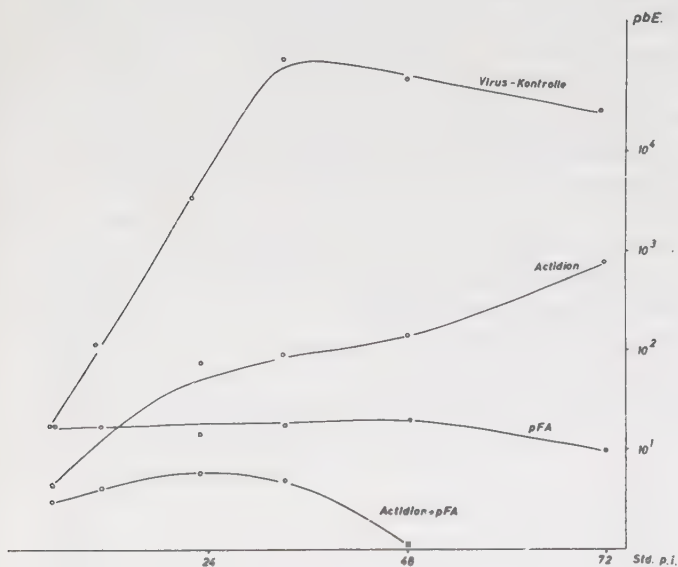


Abb. 15: Die Wirkung der Hemmstoffkombination Actidion + para-Fluorphenylalanin (pFA) auf die Bildung infektiöser Viria im Lactalbumin-Hydrolysat-freien Medium.

D. BESPRECHUNG der ERGEBNISSE

Die Untersuchungen galten der Frage, ob das Antibiotikum Actidion eines oder mehrere der Vermehrungsstadien des Herpes-simplex-Virus in Kaninchennieren-Zellkulturen zu beeinflussen vermag.

Bei Vermehrungsversuchen in unbehandelten Zellkulturen, die mit einer Multiplicity von 1 beimpft wurden, machte sich zunächst der zytopathische Effekt 6 Stunden p. i. bemerkbar. Bereits zur 10. Stunde p. i. hatte er den gesamten Zellrasen erfaßt. Der Titer neugebildeten infektiösen Virus stieg meßbar erst nach der 5. Stunde exponentiell an und erreichte den Titergipfel etwa 20 Stunden p.i. Somit entsteht in den für unsere Versuche gewählten Kaninchennieren-Zellkulturen hinsichtlich der Virusvermehrung eine gute Übereinstimmung mit anderen Zellkulturen. - In FL-Zellen (NII et al. 1961), sowie in HEp-2-Zellen (ROIZMAN et al. 1963) und HeLa-Zellen (GRAY et al. 1958) war neugebildetes Virus erstmals zwischen der 4. bis 6. Stunde nachweisbar. Der exponentielle Anstieg der Kurven in FL-, HEp-2-Zellen sowie auch in unseren Kulturen fiel in die 6. bis 10 Stunde. Nach Berechnungen von ROIZMAN (1963) verdoppelte sich der Virustiter während dieser Zeitspanne alle 40 Minuten. Das Titermaximum war zwischen der 20. und 40. Stunde p. i. erreicht.

Die zytotoxische Wirkung hoher Dosen von Actidion ist ausgeprägt. In unserem System verursachte Actidion in der niedrigen Konzentration von 0,90 μ und 0,50 μ /ml Medium während 5-tägiger Einwirkung keine nennenswerten morphologischen Zellschädigungen. So berichtete auch HAFF (1964), daß die Dosis von 1 μ /ml Medium von Kaninchennierenzellen toleriert wird.

FALKE und RICHTER (1961) beschrieben die Veränderungen in FL-Zellen, soweit sie sich im Phasenkontrast-Mikroskop erkennen lassen. Ausdruck geringer Zellschädigung waren Einziehungen ihrer Plasmafortsätze. Die Kernrotation und

Granulabewegung, welche als Indikatoren der Aktivität des Zellstoffwechsels angesehen werden können, waren noch vorhanden. Auch die Kerngröße und die Nukleoli waren anfangs nicht verändert.

In Dosis-Wirkungs-Versuchen ergab sich, daß hohe Konzentrationen (1,80 μ bis 0,20 μ /ml) den zytopathischen Effekt und die Entstehung infektiöser Partikel vollständig verhindern. Sehr geringe Mengen Actidion (z.B. 0,03 μ /ml) bewirkten bereits eine Reduktion der Menge neuer infektiöser Viria auf 10 %, obwohl der Zellrasen noch zu 75 % zytopathisch verändert war. Verlängert man die Beobachtungsdauer auf etwa 48 Stunden (Abb. 5), so treten diese Unterschiede noch deutlicher hervor. Geringe Konzentrationen von Actidion beeinflussen also die Infektiosität viel stärker als den zytopathischen Effekt. Dieses Ergebnis bestätigt Versuche von FALKE (1963), der die Dissozilierbarkeit der Riesenzell-Entstehung von der Bildung infektiöser Viria mit para-Fluorphenylalanin festgestellt hatte. Auch MUNK und SAUER (1964) sind bei der Anwendung mit Mitomycin C zu ähnlichen Ergebnissen gekommen.

Bereits bei den Vermehrungsversuchen hat sich gezeigt, daß die Riesenzellen etwas früher nachweisbar werden als die Infektiosität. Mit Hemmstoffdosen, die eine vollständige Vermehrungshemmung herbeiführen, untersuchten wir die einzelnen Stadien der Virusneubildung. Die Versuchsanordnung entsprach Angaben von KAPLAN (1957), MC N. SCOTT et al. (1961), SMITH et al. (1964) sowie AURELIAN et al. (1964). In Übereinstimmung mit KAPLAN (1957) haben unsere Viruskontrollen nach 120 Minuten nahezu 100 % des inokulierten Virus adsorbiert. Während dieser ersten beiden Stunden p. i. kann im Medium vorhandenes Actidion den Adsorptionsvorgang nicht beeinflussen. Auch eine Vorbehandlung der Zellen beeinflusst diese Phase nicht. Die gleiche Beobachtung ist auch mit anderen Hemmstoffen, z.B. Jod-Desoxyuridin (SMITH et al. 1964), gemacht worden.

Auf die Penetrationsphase übt Actidion jedoch einen deutlich hemmenden Einfluß aus. Bereits 40 Minuten p. i. waren Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen zu bemerken. Sie äußerten sich in einer etwa 40%igen Minderung des Virusgehaltes der Zellen - 60 Minuten p. i.. Mit Dosen von 0,50 μ /ml wurde dieser Effekt über mindestens 2,5 Stunden p. i. aufrecht erhalten. Dieser Befund beruht möglicherweise auf einer Störung der Energielieferung für die Viroplexis oder einer anderen Wirkung auf die Zellmembranen unbekannter Art. Dagegen hat Puromycin nach ROIZMAN et al. (1963) als Hemmstoff der Proteinsynthese keinen Einfluß auf die Phase.

Um den spätesten Zeitpunkt der noch möglichen Hemmung von Riesenzellbildung und Infektiosität zu bestimmen und um eine Aufgliederung der Syntheseschritte zu erreichen, fügten wir infizierten Kulturen Actidion, zeitlich abgestuft, hinzu. Während die Entstehung von Riesenzellen bei Zugabe zur 4. Stunde p. i. nicht mehr zu verhindern war, blieb die Hemmstoffzugabe auf die Infektiosität erst nach der 7. Stunde p. i. wirkungslos. Actidion ist also bereits vor der 7. Stunde p. i. nur noch teilweise wirksam, so daß ein zytopathischer Effekt entsteht.

In Verbindung mit den Untersuchungen von FALKE (1965) über den Einfluß von Actinomycin C und para-Fluorphenylalanin auf die Synthese des Herpes-Virus läßt sich folgende Vorstellung entwickeln: Bis zur 2. Stunde p. i. (einschließlich) hemmen Actinomycin und para-Fluorphenylalanin die Riesenzellbildung und alle anderen Syntheseschritte in Kaninchennierenzellen vollständig. Die Neubildung infektiöser Partikel kann durch Zugabe dieser Substanzen sogar bis zur 4. Stunde p. i. (einschließlich) unterdrückt werden. Da Actidion die Riesenzellbildung bis zur 3. Stunde (einschließlich) blockierte, muß sich an diesen Programmierungsschritt (Actinomycin-Empfindlichkeit zur 2. Stunde) noch ein Vorgang anschließen, der die genetische Information für die Riesenzellbildung in die "Sprache" der Proteine übersetzt. An einen 2. "Programmierungsschritt" für die Reifung infektiöser Viria (Actinomycin-Empfindlichkeit zur 4. Stunde), der sich auch durch eine Membranblockade er-

klären ließe, schließt sich erneut eine Übersetzung in die Protein-"Sprache" an, die etwa zur 6. Stunde vollendet ist, und die durch Actidion infolge der Hemmwirkung auf die Proteinsynthese blockiert wird. Erst nach diesem Zeitpunkt ließen sich in entsprechenden Versuchen erstmals neugebildete, infektiöse Viria nachweisen.

Diese Befunde und ihre Deutung stimmen zeitlich mit den Aussagen von RUSSEL et al. (1964) über Fermente und Antigene überein. Demnach steigt zur 2. Stunde und danach der Gehalt an DNS-Nukleotidyltransferase, einer DNS-Polymerase, deutlich an. Zur 2. bis 3. Stunde p. i. wird außerdem erstmals ein Komplementbindungsantigen nachweisbar. - ROIZMAN et al. (1963) berichtet, in Übereinstimmung mit RUSSEL et al. (1964), daß Enzyme zur Nutzbarmachung des Thymidins zwischen der 2. und 4. Stunde p. i. für die DNS-Synthese entstehen. Diese ist nach ROIZMAN et al. (1963) und FALKE (1965) zwischen der 4. und 5. Stunde p. i. abgeschlossen. Erste komplette Virusteilchen werden zur 5. Stunde und später gebildet (RUSSEL et al. 1964).

Da Actidion die Herpes-Synthese unter geeigneten Bedingungen völlig hemmen kann, wollten wir feststellen, wie lange das Virus in den Kulturen in infektiöser Form vorliegt. - Die nach 6 Tagen Hemmstoffeinwirkung gemessene Infektiosität lag niedriger als in den Kontrollkulturen. Das Auswaschen von Actidion zu beliebigen Zeitpunkten p. i. gab jedesmal mit einer geringen Verzögerung gegenüber den Kontrollen die Virusvermehrung frei. Die Wirkung von Actidion ist also reversibel. Auch der zytopathische Effekt setzte verspätet ein.

Schließlich wurde versucht, durch die Kombination mit anderen Hemmstoffen die Wirkung von Actidion zu steigern, was vor allem in therapeutischer Hinsicht wichtig wäre, da Hemmstoffe mit verschiedenen Angriffspunkten gewählt wurden. Die Kombination von Actidion mit para-Fluorphenylalanin bzw. Actidion mit Proflavin erwies sich wirkungsvoller als die Substanzen für sich allein. Die Konzentrationen aller drei Substanzen wurde gering gehalten, um den Effekt deutlich

erkennen zu können. Actidion, in Kombination mit para-Fluorphenylalanin, hemmte die Virussyntese stärker als die Kombination mit Proflavin. Die Wirkung ist additiv. Der Effekt Actidion- para-Fluorphenylalanin ließ sich durch Fortlassen von Lactalbumin-Hydrolysat steigern, wodurch das Aminosäureangebot verringert wird. Auch dieses Verhalten beweist die Reversibilität der Hemmung durch para-Fluorphenylalanin, die bereits von FALKE (1965) gezeigt worden war.

Schließlich war untersucht worden, in wie weit Actidion den Ablauf der virusbedingten Zellveränderungen beeinflusst. Die infizierten Kontrollkulturen wiesen 24 Stunden p. i. charakteristische Veränderungen auf, wie randständiges Chromatin und Hyalinisierung des Karyoplasmas mit Auftreten freier Granula. Einschlusskörperchen vom Typ A nach COWDRY wurden - wegen der kurzdauernden Fixierung mit Carnoy-Lösung - nicht beobachtet. Virusbedingte Zellveränderungen wurden unter dem Einfluß von Actidion vermißt. Auffallend waren amitose-ähnliche Kernteilungsfiguren, die in Kulturen auftraten, die Actidion, allein oder nach der Infektion mit Virus, erhalten hatten. Eine Deutung dieses Befundes ist aufgrund der vielfältigen, zum Teil noch unbekannten Einflüsse von Actidion auf den Stoffwechsel allerdings noch nicht möglich.

E. ZUSAMMENFASSUNG der ERGEBNISSE

1. Die einzelnen Phasen der Vermehrung des Herpes-simplex-Virus verlaufen unter den gewählten Bedingungen der Kaininchen-Zellkulturen auch zeitlich wie in anderen Zellkultursystemen.
2. Eine zytotoxische Wirkung des Actidion auf die Zellkultur ist unterhalb von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium morphologisch nicht mehr nachweisbar.
3. Actidion wirkt nicht viruzid. Die Virussyntese und der zytopathische Effekt lassen sich durch Zugabe geeigneter Konzentrationen des Actidion ($1,8 - 0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Medium) bis zur 3. Stunde p. i. (einschließlich) vollständig unterdrücken. Die Zugabe des Hemmstoffs nach der 4. Stunde p. i. ermöglicht wieder die Riesenzell-Bildung. Infektiöse Viria können erst dann entstehen, wenn Actidion nach der 7. Stunde p. i. zugeführt wird.
Damit besteht die Möglichkeit, die Riesenzell-Bildung von der Neubildung von infektiösen Viruspartikeln zu dissoziieren.
4. Die Adsorption des Herpes-simplex-Virus wird durch Actidion nicht beeinflusst, jedoch seine Penetration in die Wirtszelle deutlich erschwert.
5. Die kombinierte Anwendung von Actidion mit para-Fluor-phenylalanin oder Proflavin verstärkt die Hemmung der Virussyntese. Es handelt sich um eine additive Wirkung.
6. Die Wirkung des Actidion ist reversibel. Nach Auswaschen des Präparates stellt sich mit geringer Verzögerung ungehemmte Virusvermehrung ein.

F. LITERATURANGABEN

ABEL, B. (1963):

Reactivation of Heated Vaccinia Virus in Vitro
Zschr. Vererbl. 94, 249 - 252;

AURELIAN, L. and B. ROIZMAN (1964):

The Host Range of Herpes-simplex-Virus.
Interferon, Viral DNA, and Antigen Synthesis
in Abortive Infection of Dog Kidney Cells.
Virology 22, 452 - 461;

BACHTHOLD, J.G., H.C. BUBEL and L.P. GEBHARDT (1957):

The Primary Interaction of Poliomyelitis Virus
with Host Cells of Tissue Culture Origin.
Virology 4, 582 - 589;

BEN-PORAT, T. and A.S. KAPLAN (1962):

The Chemical Composition of Herpes Simplex
and Pseudorabies Viruses.
Virology 16, 261 - 266;

BENNETT, L.L., D. SMITHERS and C.T. WARD (1964):

Inhibition of DNA Synthesis in Mammalian
Cells by Actidione.
Biochim. biophysica acta 87, 60 - 69;

BURNET, F.M. and S.W. WILLIAMS (1939):

Herpes-Simplex: A New Point of View.
Austral. Med. J. 1, 637 - 642;

BURNET, F.M. and S.G. ANDERSON (1946):

Modifikation of Human Red Cells by Virus Action
II. Agglutination of Modified Human Red Cells
by Sera from Cases of Infectious Mononucleosis.
Brit. J. Exper. Path. 27, 236 - 243;

- CASPAR, D.L.D., R. DULBECCO, A. KLUG, A. LWOFF, M.G.P.
STOKER, P. TOURNIER and P. WILDY (1962):
Proposals, Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. XXVII, 49;
- CROUSE, H.V., L.L. CORIELL, H. BLANK, and T.F. Mc N. SCOTT
(1950):
Cytochemical Studies on the Intranuclear
Inclusion of Herpes-Simplex.
J. Immunol. 65, 119 - 128;
- DALES, S. and L. SIMINOVITCH (1961):
The Development of Vaccinia Virus in Earle's
Strain Cells as Examined by Electron Microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 475 - 503;
- DELAMORE, J.W. and W.H. PRUSOFF (1962):
Effect of 5-Jod-2'-Deoxyuridine on the
Biosynthesis of Phosphorylated Derivate
of Thymidine.
Biochem. Pharmacol. 11, 101 - 112;
- DULBECCO, R. and M. VOGT (1954):
Plaque Formation and Isolation of Pure Lines
with Poliomyelitis Viruses.
J. Exper. Med. 99, 167 - 182;
- EPSTEIN, M.A. (1962):
Nucleic Acid of Mature Herpes-Simplex-Virus:
Its Type and Location.
Nature 194, 116;

Observations on the Mode of Release of Herpes-
Virus from Infected HeLa Cells.
J. Cell Biol. 12, 589 - 597;

Observations on the Fine Structure of Mature
Herpes-Simplex-Virus and on the Composition of
its Nucleoid.
J. Exper. Med. 115, 1 - 12;

- FALKE, D. (1963):
Dissoziation von Riesenzellbildung und Infek-
tiosität des Herpes-simplex-Virus unter dem
Einfluß von para-Fluorphenylalanin.
Naturwiss. 14, 507;
- FALKE, D. (1965):
Beziehungen zwischen Riesenzellbildung und
Infektiosität bei Herpes-simplex-Virus.
Arch. Virusforsch. (im Druck);
- FALKE, D. und J.E. RICHTER (1961):
Über die Einwirkung von ECHO-12-Virus und
Hemmstoffen zur Eiweißsynthese auf Zellkulturen.
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 183, 283 - 293;
- FALKE, D., R. SIEGERT und W. VOGELL (1959):
Elektronenmikroskopische Befunde zur Frage der
Doppelmembranbildung des Herpes-simplex-Virus
Arch. Virusforsch. 9, 484 - 496;
- FARNHAM, A.E. (1958):
The Formation of Microscopic Plaques by Herpes-
simplex-Virus in HeLa Cells.
Virology 6, 317 - 327;
- FAZEKAS de ST. GROTH and D. GRAHAM (1949):
Modification of Virus Receptors by Metaperiodate
II. Infection through Modified Receptors.
Austral. J. Exper. Biol. 27, 83 - 98;
- GRAY, A., T. TOKUMARU und T.F. Mc NAIR SCOTT (1958):
Different Cytopathogenic Effects observed in
HeLa Cells Infected with Herpes-simplex-Virus.
Arch. Virusforsch. 8, 59 - 76;
- HAFF, R.F. (1964):
Inhibition of the Multiplication of Pseudorabies
Virus by Cycloheximide.
Virology 22, 430 - 431;
- HOLMES, I.H. and D.H. WATSON (1963):
An Electron Microscope Study of the Attachment
and Penetration of Herpes Virus in BHK 2 Cells.
Virology 21, 112 - 123;

KAPLAN, A.S. (1957):

A Study of the Herpes-simplex-Virus - Rabbit
Kidney Cell System by the Plaque Technique.
Virology 4, 435 - 457;

KAPLAN, A.S. and T. BEN-PORAT (1963):

The Pattern of Viral and Cellular DNA Synthesis
in Pseudorabies Virus-Infected Cells in the
Logarithmic Phase of Growth.
Virology 19, 205 - 214;

KAUFMAN, H.E., A.B. NESBURN and E.D. MALONEY (1962):

J-Deoxyuridine Therapy of Herpes Simplex.
Arch. Opth. 67, 583 - 591;

KOHLHAGE, H. (1961):

Vortrag Med. Ges. Marburg/L. am 20. 6. 1960:
Genetisch fixierte Varianten eines Herpes-
simplex-Stammes.
Klin. Wschr. 39, 161;

KOHLHAGE, H. und R. SIEGERT (1962):

Zwei genetisch determinierte Varianten eines
Herpes-simplex-Stammes.
Arch. Virusforsch. 12, 273 - 286;

LATUASAN, H.E. and W. BERENDS (1958):

The Actidion Mechanism of Acti-dione.
Recueil trav. chim. 77, 416 - 424;

LAUDA, E. und P. REZEK (1926):

Zur Histopathologie des Herpes-simplex.
Virchows Arch. path. Anat. 262, 827 - 837;

LEBRUN, J. (1956):

Cellular Localization of Herpes-simplex-Virus
by Means of Fluorescent Antibody.
Virology 2, 496 - 510;

- LÉPINE, P., C. CHANY, B. DROZ, and F. ROBBE-FOSSAT (1959):
Cytopathogenic Effect of Two Newly Recognized
Myxovirus Strains: Mechanism of Syncytial
Formation.
Annual N. Y. Acad. Sci. 81, 62 - 72;
- LERMAN, L.S. (1963):
The Structure of the DNA-Acridine Complex.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 94 - 102;
- MORGAN, C., S.A. ELLISON, H.M. ROSE and D.H. MOORE (1953):
Electron Microscopic Examination of Inclusion
Bodies of Herpes-simplex-Virus.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 82, 454 - 457;
- MORGAN, C., S.A. ELLISON, H.M. ROSE and D.H. MOORE (1954):
Structure and Development of Viruses as Observed
in the Electron Microscope
I. Herpes-simplex-Virus.
J. Exper. Med. 100, 195 - 202;
- MORGAN, C., E.P. JONES, M. HOLDEN and H.M. ROSE (1958):
Intranuclear Crystals of Herpes-simplex-Virus
Observed with the Electron Microscope.
Virology 5, 568 - 571;
- MORGAN, C., H.M. ROSE, M. HOLDEN and E.P. JONES (1959):
Electron Microscopic Observations on the
Development of Herpes-simplex-Virus.
J. Exper. Med. 110, 643 - 656;
- MUNK, K. and W.W. ACKERMANN (1953):
Some Properties of Herpes-simplex-Virus.
J. Immunol. 71, 425 - 430;
- MUNK, K. and G. SAUER (1964):
Relationship between Cell DNA Metabolism and
Nucleocytoplasmic Alterations in Herpes Virus
Infected Cells.
Virology 22, 153 - 154;

MURPHY, M.L. (1960):

5-Fluoro-2-Deoxyuridine.

Ciba-Foundation-Symposium on Congenital Malformations 1960, Churchill Ltd., London;

MUSGAY, M. (1963):

Struktur und Vermehrungsmodus animaler Virusarten.

Arch. Hyg. 147, 223 - 240, 452 - 480, 552 - 576, 616 - 644;

NIELSEN, G. und D. PETERS (1963):

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Initialstadien der Vaccine-Virusinfektion von HeLa-Zellen.

Arch. Virusforsch. 12, 496 - 513;

NII, S. and J. KAMAHORA (1961):

Studies on the Growth of a Newly Isolated Herpes-simplex-Virus in vitro.

Biken's J. 4, 75 - 96;

NII, S. and J. KAMAHORA (1961):

Cytopathic Changes Induced by Herpes-simplex-Virus.

Biken's J. 4, 255 - 270;

PUCK, T.T. and B.P. SAGIK (1953):

Virus and Cell Interaction with Ion Exchanges.

J. Exper. Med. 97, 807 - 820;

RIVERS, T.M., E. HAAGEN and R.S. MUCKENFUSS (1929):

Development in Tissue Cultures of the Intracellular Changes Characteristic of Vaccinal and Herpetetic Infections.

J. Exper. Med. 50, 665 - 672;

RÖHRBORN, G. (1960):

Chemische Konstitution und mutagene Wirkung.

Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene.

Experientia 16, 523 - 529;

ROIZMAN, B. (1963):

Reversible Inhibition of Herpes Simplex
Multiplication in HEp-2 Cells with Phenethyl
Alcohol.

Virology 19, 580 - 582;

ROIZMAN, B., L. AURELIAN and R. ROANE (1963):

The Multiplication of Herpes-simplex-Virus
I. The Programming of Viral DNA Duplication
in HEp-2 Cells.

Virology 21, 482 - 498;

ROSS, R.W. and E. ORLANS (1958):

The Redistribution of Nucleic Acid and the
Appearance of Specific Antigen in HeLa Cells
Infected with Herpes-Virus.

J. Path. Bact. 76, 393 - 402;

RUSSELL, W.C.: (1962):

Herpes Virus Nucleic Acid.

Virology 16, 355 - 357;

RUSSELL, W.C., H. GOLD, H. OMURA, H.M. KEIR, D.H. WATSON
and P. WILDY (1964):

The Growth of Herpes Simplex and its Nucleic Acid.

Virology 22, 103 - 110;

SCHERER, W.F. and J.T. SYVERTON (1954):

The Viral Range in Vitro of a Malignant Human
Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey)

I. Multiplication of Herpes Simplex, Pseudorabies
and Vaccinia Viruses.

Am. J. Path. 30, 1057 - 1073;

SCHWÖBEL, W. und A. MAYR (1957):

Die Züchtung des Vaccinevirus in Zungengewebe-
kulturen vom Rind.

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 167, 188 - 200;

- SCOTT, T.F. Mc N., H. BLANK, L.I. CORIELL and A. GRAY (1953):
The Growth Curve of the Virus of Herpes Simplex
on the Chorioallantoic Membrane of the Embryonated
Henn's Egg.
J. Immunol. 71, 134 - 144;
- SCOTT, T.F. Mc N., D.L. Mc LEOD and T. TOKUMARU (1961):
A biologic Comparison of Two Strains of
Herpesvirus Hominis.
J. Immunol. 86, 1 - 12;
- SIEGERT, R. und D. FALKE (1963): unveröffentlicht;
- SMITH, K.O. and C.D. DUKES (1964):
Effects of 5-Jodo-2-Deoxyuridine (JDU) on
Herpesvirus Synthesis and Survival in Infected
Cells.
J. Immunol. 92, 550 - 554;
- SOSA-MARTINEZ, J., L. GUTIERREZ-VILLIGAS and R.M. SOSA(1955):
Propagation of Herpes-simplex-Virus in Tissue
Cultures of Rabbit Kidney.
J. Bact. 70, 391 - 399;
- STOKER, M.G.P. (1957):
Latent Infections with Viruses and Rickettsiae.
Brit. Med. J. I. 963 - 968;
- STOKER, M.G.P. (1958):
Mode of Intracellular Transfer of Herpes Virus.
Nature 182, 1525 - 1526;
- STOKER, M.G.P. and A. NEWTON (1959):
The Effect of Herpes Virus on HeLa Cells
Dividing Parasynchronously.
Virology 7, 438 - 448;
- WATSON, D.H. and P. WILDY:(1963):
Some Serological Properties of Herpes Virus
Particles Studied with the Electron Microscope.
Virology 21, 100 - 111;

- WATSON, D.H., W.C. RUSSEL and P. WILDY (1963):
Electron Microscopic Particle Counts on Herpes
Virus Using the Phosphotungstate Negative
Staining Technique.
Virology 19, 250 - 260;
- WILDY, P., W.C. RUSSEL and R.W. HORNE (1960):
The Morphology of Herpes Virus.
Virology 12, 204 - 222;
- WOLLENSAK, J. (1961):
Neuere Gesichtspunkte zur Therapie des Herpes
corneae.
Klin. Mbl. Augenhk. (Stuttgart) 138, 588;
- WOLLENSAK, J. (1963):
Antimetaboliten zur Therapie von Viruserkran-
kungen der Binde- und Hornhaut.
III. International Congress of Chemotherapy
Stuttgart, am 23. 7. 1963;
- WOLMAN, M. and A. BEHAR (1952):
Cytochemical Evidence for the Nature of Herpes
Simplex Inclusion Bodies.
J. Infect. Dis. 91, 63 - 71.

Herrn Professor Dr. med. R. SIEGERT möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und seine Anregungen zu dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dozent Dr.med. D. FALKE für das Thema, die Anleitung zum virologischen Arbeiten und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

In Marburg/L.: Beckman, Berendes, Bock, Braun-Falco,
Bücher, Dimroth, Falke, Gedigk, Golenhofen,
Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt,
Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Lang,
Linneweh, Lübbers, Mahr, Mattes, Maurath,
du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Niessing,
Nieth, Oksche, Overbeck, Petry, Rodeck,
Rohen, Sauer, Schleyer, Schmid, Schmitz,
Schölmerich, Schwaiger, Siegert, Siess,
Stein, Stender, Straub, Streicher, Vogt,
Walcher, Würterle.

In Freiburg/Br.: Bätzner, Büchner, Eschler, Füsslin,
Heilmeyer, Krauss, Rehm, Wimböfer.

Lebenslauf

Am 21. 8. 1936 wurde ich, Klaus-Dieter Niessing, als Sohn des wissenschaftlichen Assistenten Klaus Niessing und seiner Ehefrau Lydia Elisabetha, geb. Bieker, in Kiel geboren. Meine Kindheit verlebte ich im elterlichen Hause in Kiel und Freiburg/Br.. Im Herbst 1942 wurde ich in die Volksschule in Freiburg/Br. eingeschult. Diese Schule besuchte ich bis zum Herbst 1943. Durch einen Wohnortwechsel meiner Familie kam ich sodann nach Markkleeberg bei Leipzig. Ich besuchte die dortige Volksschule von 1943 bis Herbst 1947. Es folgte ein erneuter Wohnortwechsel nach Marburg/L.. Hier besuchte ich von 1948 bis Frühjahr 1949 die Friedrich-Ebert-Volksschule. Von 1949 bis 1959 ging ich im privaten Gymnasium "Steinmühle" bei Cappel Krs. Marburg/L. zur Schule. Hier erhielt ich im Frühjahr 1959 das Zeugnis der Reife. Mit dem Beginn des SS 1959 immatrikulierte ich mich in der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg/L.. Im Frühjahr 1962 bestand ich vor dem Prüfungsausschuß in Marburg/L. die ärztliche Vorprüfung. Zum WS 1962/63 verließ ich Marburg/L. und immatrikulierte mich in der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Hier blieb ich ein Semester und wechselte dann wieder zur Universität Marburg/L. über. Im SS 1965 habe ich mich dort zum medizinischen Staatsexamen angemeldet.

